

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI
(c) 2005 Thomson Derwent. All rts. reserv.

012884381 **Image available**

WPI Acc No: 2000-056214/ 200005

XRAM Acc No: C00-014946

**3-hydroxy and 5-(difluoro phenoxy) polyester - useful for making
biodegradable plastic**

Patent Assignee: NAGOYA-SHI (NAGO-N); NAGOYA SHI (NAGO-N)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week	
JP 2989175	B1	19991213	JP 98262447	A	19980831	200005	B
JP 2000072865	A	20000307	JP 98262447	A	19980831	200023	

Priority Applications (No Type Date): JP 98262447 A 19980831

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
-----------	------	-----	----	----------	--------------

JP 2989175	B1	7		C08G-063/682	
------------	----	---	--	--------------	--

JP 2000072865	A	7		C08G-063/682	
---------------	---	---	--	--------------	--

Abstract (Basic): JP 2989175 B

NOVELTY - The structure of polyester has the 3-hydroxy and 5-(mono fluoro phenoxy)-group as the repeating unit which is given by the formula (1). DETAILED DESCRIPTION - An INDEPENDENT CLAIM is also included for the manufacturing method of polyester by fermentation synthesis using a microorganism.

USE - The polyester is useful for making biodegradable plastic.

ADVANTAGE - Since fluorine group is introduced in the phenoxy group, 100% of the copolymer is synthesized. The melting point of the obtained polymer is more than 100 deg. C. Improved water repellent optical resolution property and characteristic stereo regularity are expectable.

Dwg.0/0

Title Terms: HYDROXY; PHENOXY; POLYESTER; USEFUL; BIODEGRADABLE; PLASTIC

Derwent Class: A23; D16

International Patent Class (Main): C08G-063/682

International Patent Class (Additional): C12N-001/20; C12P-007/62;
C12R-001-40

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): A05-E02; A10-D05; D05-A04; D05-C

Polymer Indexing (PS):

<01>

001 018; D11 D10 D19 D18 D31 D76 D50 D90 F- 7A D69 F34 D63; P0839-R F41
D01 D63; H0293; L9999 L2528 L2506; L9999 L2404; L9999 L2573 L2506

002 018; B9999 B3021 B3010; B9999 B5607 B5572; B9999 B3509 B3485 B3372;
B9999 B4240-R; B9999 B4944-R B4922 B4740; ND03

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 1)

(11)特許番号

第2989175号

(45) 発行日 平成11年(1999)12月13日

(24) 登録日 平成11年(1999)10月8日

(51) Int.Cl.
C 0 8 G 63/682
C 1 2 N 1/20
C 1 2 P 7/62
// (C 1 2 N 1/20
C 1 2 R 1/40)

識別記号

F. II

C 08 G 63/682
C 12 N 1/20
C 12 P 7/62

8

請求項の数11(全 7 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平10-282447
(22)出願日 平成10年(1998)8月31日
審査請求日 平成11年(1999)1月27日
微生物の登録番号 FERM P-16953

(73)特許権者 591270556
名古屋市
愛知県名古屋市中区三の丸3丁目1番1
号
(72)発明者 高木 康雄
愛知県名古屋市北区上飯田北町1丁目65
番
(72)発明者 安田 良
愛知県名古屋市千種区星ヶ丘1丁目23番
地の4
(74)代理人 加藤 譲政
審査官 大鏡 塞治

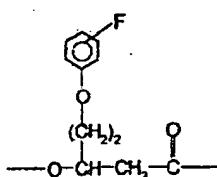
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリエステル及びその製造方法

(57) [特許請求の範囲]
【請求項1】3-ヒドロキシ、5-(モノフルオロフェノキシ)ペンタノエート(3H5(MFP)P)ユニットのスカラーリングアリコドリ

「化」上

3 H 5 (M E P) P

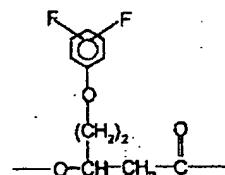


【請求項2】3-ヒドロキシ、5-(ジフルオロフェノキシ)ベンタノエート(3H5(DFP)P)ユニット

のみからなるポリエステル。

〔化2〕

3H5 (DFP) P.



10

【請求項3】3-ヒドロキシ、5-(モノフルオロフェノキシ)ペンタノエート(3H5(MFP)P)ユニットを70モル%から99モル%、3-ヒドロキシ、7-(モノフルオロフェノキシ)ヘプタノエート(3H7(MFP)H)ユニットを30モル%から1モル%含

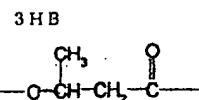
これを発酵合成する微生物およびその製造方法に関する。詳しくは自然環境（土中、河川、海中）の下で微生物の作用を受けて分解するプラスチック様高分子およびその製造方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術・発明が解決しようとする課題】今まで数多くの微生物において、エネルギー貯蔵物質としてポリエステルを菌体内に蓄積することが知られている。その代表例がポリ-3-ヒドロキシブチレート（以下、P-3HB）と略す）であり、下記の式で示されるモノマー-ユニット（3HB）からなるホモポリマーである。

【0003】

【化10】



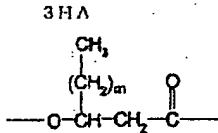
3HB

【0004】P（3HB）は確かに自然環境中で分解されるポリマーであるが、高分子材料としてみた場合、結晶性が高く、硬く、かつ脆い性質を持っており、実用的には不十分であった。これを解決するために特開昭57-150393号公報、特開昭58-69225号公報、特開昭63-269989号公報、特開昭64-48821号公報、特開平1-156320号公報、特開平5-93049号公報によればポリエステルを合成するモノマー-ユニットとして3HB以外の構造的に異なる炭素数が3から6のモノマー-ユニットを組み込むことでこのような欠点を克服することが提案されている。

【0005】また、特開昭63-229291号公報によれば、炭化水素資化性菌であるシュードモナス・オレオボランスATCC29347に炭素数6～12までの3-ヒドロキシアルカノエート（3HAと略す）をモノマー-ユニットとする共重合体P（3HA）を発酵合成できることが報告されている。このタイプの共重合体は側鎖のメチレン数が多く、性状は粘着性高分子である。

【0006】

【化11】



3HA

【0007】このように現在のところ、側鎖の鎖長を変えたタイプの共重合体が提示されている。即ち、側鎖のメチレン基数の多少による物性のコントロールである。しかしながら、微生物を使用した発酵合成では化学的な大量合成に比べると効率が悪く、一般的な汎用プラスチックのコストに対抗するのは困難であるといわれてきた。このため、機能性を併せ持つ付加価値の高いポリマーを合成できる菌株の探索が課題となっていた。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは化学合成した自然界に存在しない脂肪酸を資化して菌体内にポリエステルを合成し、蓄積する微生物を探索していたところ、資化効率の高い微生物を発見し、さらに研究を重ねて本発明を完成するに至った。

【0007】即ち、本発明者らの見い出した微生物はフェノキシ基上にフッ素原子が1個あるいは2個置換したフェノキシアルカン酸を唯一の炭素源として生育しポリエステルを合成させる27N01株である。この微生物が発酵合成するポリマーのモノマー-ユニットを分析したところ、フッ素原子が置換した構造である3-ヒドロキシ、5-（モノフルオロフェノキシ）ベントノエート（3H5（MFP）Pと略す）、3-ヒドロキシ、5-（ジフルオロフェノキシ）ベントノエート（3H5（DFP）Pと略す）、3-ヒドロキシ、7-（モノフルオロフェノキシ）ヘプタノエート（3H7（MFP）Hpと略す）、3-ヒドロキシ、7-（ジフルオロフェノキシ）ヘプタノエート（3H7（DFP）Hpと略す）が完全にポリマーとなっていることがNMR分析により確認された。この微生物を同定したところ、27N01株

30 はシュードモナス・ブチダであることが判明した。

【0008】

【化12】 3H5（MFP）P

【化13】 3H5（DFP）P

【化14】 3H7（MFP）Hp

【化15】 3H7（DFP）Hp

【0009】本発明はこの微生物を見い出したことに基づくものである。即ち、本発明の要旨は、（1）3-ヒドロキシ、5-（モノフルオロフェノキシ）ベントノエート（3H5（MFP）P）ユニットのみからなるポリエステル、（2）3-ヒドロキシ、5-（ジフルオロフェノキシ）ベントノエート（3H5（DFP）P）ユニットのみからなるポリエステル、（3）3-ヒドロキシ、5-（モノフルオロフェノキシ）ベントノエート（3H5（MFP）P）ユニットを70モル%から99モル%、3-ヒドロキシ、7-（モノフルオロフェノキシ）ヘプタノエート（3H7（MFP）Hp）ユニットを30モル%から1モル%含む共重合体ポリエステル、（4）3-ヒドロキシ、5-（ジフルオロフェノキシ）ベントノエート（3H5（DFP）P）ユニットを70モル%から99モル%、3-ヒドロキシ、7-（ジフル

オロフェノキシ)ヘプタノエート(3H7 (DFP) H p)ユニットを30モル%から1モル%含む共重合体ポリエステル、(5)少なくとも3-ヒドロキシ、5-(モノフルオロフェノキシ)ペンタノエート(3H5 (MFP) P)ユニットを含有する3成分系のモノマーユニットからなる共重合体ポリエステル、(6)少なくとも3-ヒドロキシ、5-(ジフルオロフェノキシ)ペンタノエート(3H5 (DFP) P)ユニットを含有する3成分系のモノマーユニットからなる共重合体ポリエステル、(7)第2および第3成分として、3-ヒドロキシヘキサノエート(3HHx)ユニット、3-ヒドロキシヘプタノエート(3HHP)ユニット、3-ヒドロキシオクタノエート(3HO)ユニット、3-ヒドロキシノナノエート(3HN)ユニットおよび3-ヒドロキシデカノエート(3HD)ユニットからなる群から選ばれる2つのユニットを有する(3H5 (MFP) P)との共重合ポリエステル、(8)第2および第3成分として、3-ヒドロキシヘキサノエート(3HHx)ユニット、3-ヒドロキシヘプタノエート(3HHP)ユニット、3-ヒドロキシオクタノエート(3HO)ユニット、3-ヒドロキシノナノエート(3HN)ユニットおよび3-ヒドロキシデカノエート(3HD)ユニットからなる群から選ばれる2つのユニットを有する3H5 (DFP) Pとの共重合ポリエステル、(9)前記(1)～(8)に記載されたポリエステルを合成するシードモナス・ブチダ、並びに

【0010】(10)シードモナス属の微生物を用い

る前記(1)～(9)のポリエステルの製造法に関するものである。具体的には

- 1) シュードモナス属の微生物を、炭素源として芳香環にフッ素原子が1個、結合しているフェノキシ基を分子内に持つ脂肪酸を用いて、炭素源以外の栄養源の制限下で培養することを特徴とする、3-ヒドロキシ、5-(モノフルオロフェノキシ)ペンタノエート(3H5 (MFP) P)ユニットを有するポリエステルの製造方法、
- 10 2) シュードモナス属の微生物を、炭素源として芳香環にフッ素原子が2個、結合しているフェノキシ基を分子内に持つ脂肪酸を用いて、炭素源以外の栄養源の制限下で培養することを特徴とする、3-ヒドロキシ、5-(ジフルオロフェノキシ)ペンタノエート(3H5 (DFP) P)ユニットを有するポリエステルの製造方法に関するものである。

【0011】シュードモナス属の微生物を用いた本発明のポリエステルの製造方法は、従来より報告されていない。

- 20 2) シュードモナス属の微生物を、炭素源として芳香環にフッ素原子が2個、結合しているフェノキシ基を分子内に持つ脂肪酸を用いて、炭素源以外の栄養源の制限下で培養することを特徴とする、3-ヒドロキシ、5-(ジフルオロフェノキシ)ペンタノエート(3H5 (DFP) P)ユニットを有するポリエステルの製造方法に関するものである。
- 【0012】本発明の微生物であるシュードモナス・ブチダの菌学的性質は27N01について示される表1のとおりである。このような本発明の微生物として見いだされた27N01株は名古屋市西区堀越町の土壤から分離されたものであり、27N01株は特許微生物センター；受託番号FERM P-16953号として寄託されている。

【表1】

試験項目	試験結果
形態	桿菌
グラム染色性	-
芽胞	-
運動性	+
オキシダーゼ	+
カタラーゼ	+
OF	-
硝酸塩の還元	+
インドールの生成	-
グルニースからの酸の生成	-
アルギニンジヒドロラーゼ	+
ウレアーゼ	-
β ガラクトシダーゼ	-
シトクロームオキシダーゼ	+
37°Cでの生育	+
45°Cでの生育	-
チロシン	+
ゲラチン	-
質化性	-
グルコース	+
アラビノース	-
マンノース	-
マンニトール	-
Nアセチルグルコサミン	-
マルトース	-
グルコン酸	+
カブロン酸	+
アジピン酸	-
マロン酸	+
クエン酸	+
フェニル酢酸	+

【0013】このような本発明のシードモナス・ブチダ27N01株は、公知の代表的なP(3HA)産生菌であるシードモナス・オレオボランスとポリエステル生成能力において差が見られる。即ち、ポリメラーゼの3-ヒドロキシアルカニルCoAに対する特異性あって、この27N01株は作用する基質の範囲がより広い。

【0014】本発明は前記のような性質を有するシードモナスの微生物、及びこの微生物が発酵合成する微生物産生ポリエステル及びその製造方法を開示するものであり、フッ素基が導入されたポリエステルを作るための技術的手段を提供するものである。

【0015】即ち、具体的にはシードモナス属の微生物に炭素源として炭素数5以上メチレン基の末端にフルオロフェノキシ基が置換した脂肪酸を炭素源として与え、炭素源以外の栄養源の制限下、通常窒素制限下で好気的に培養するだけで目的のポリエステルを得ることができる。メチレン基のみのユニットの組成を高めたい場合は、炭素源として培養の終期に炭素数6以上の脂肪酸

を与えればよい。

【0016】このように本発明においては、シードモナス属の微生物の特徴を利用してフェノキシ基にフッ素が置換した種々のポリエステルを発酵合成することができる。現在のところ官能基を持つポリエステルを合成できる微生物としてはシードモナス・オレオボランスが報告されている、即ち、Macromolecule s. 1996、4572-4581ページによるとメチル基上に水素がフッ素に置換したカルボン酸を炭素源としてポリエステルを発酵合成した結果を報告しているが、これによれば、ポリエステルは共重合体であって、この微生物のようにホモポリマーを合成できる能力を有してはいない。

【0017】本発明の微生物を用いてポリエステルを発酵合成するには、炭素源以外の栄養源の制限下、通常、従来から知られている窒素制限条件下で培養することによって容易に得られるが、炭素源以外の必須栄養源、例えば、リン、ミネラル、ビタミン等を制限してもポリエステルは誘導される。この場合、菌体の生育が制限され

るので、通常ポリエステルの発酵合成は2段方式でおこなわれる。

【0018】1段目は菌体の増殖を目的とするものであり、栄養源の豊富な条件下で培養される。この際、菌体はポリエステル合成をほとんど行わないで、炭素源としては脂肪酸に限らず、資化可能であるものなら自由に選択できる。1段目で得られた菌体を洗浄回収して2段目において新たに炭素源を加えてポリエステルを誘導培養する。従って、この2段目の培養条件が重要であり、2段目において与えられる炭素源はポリエステル合成の原料であり、この炭素源の化学構造がポリエステルの構造を決定するといつてよい。従って、本発明において炭素源とは、2段目で与えられる炭素源を意味しており、炭素源を種々調整することにより、シードモナス属の微生物の特徴を利用して、前記のフッ素原子を含むポリエステルを発酵合成することができる。また、2段目の培養条件としては通常pH 6~8、温度25~35°C、通気量0.5~2 vvm、培養時間48~96 hrである。

【0019】発酵合成されたポリエステルの菌体からの回収は、常法により行うことができる。例えば、培養終了後、菌体を蒸留水およびメタノール等により洗浄し、減圧乾燥して得られる乾燥菌体をクロロホルム等を用いて抽出処理し、遠心分離、ろ過等により菌体除去後、抽出液にメタノールを加えてポリエステルを沈殿回収することができる。

【0020】

【実施例】以下、本発明を具体的に実施例により説明するが、本発明は以下の実施例に何ら限定されるものではない。

実施例1

シードモナス・ブチダ27N01株（特許微生物生物センター：受託番号FERM P-16953号）を以下に示す倍地を用いて30°C、24時間振盪培養した。即ち、次の倍地組成からなるものに水を加えて全量を1リットルとし（pH 7.0）、培地を調製した。

クエン酸	4 g
Na ₂ HPO ₄	2 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Mg SO ₄ · 7 H ₂ O	0. 2 g
イーストエキス	0. 3 g

【0021】培養終了後、培養プロセスを遠心分離して菌体を回収し、さらに次に示す培地中に全量を加えて、30°C、96時間振盪培養した。即ち、次の培地組成からなるものに水を加えて全量を1リットルとし（pH 7.0）、培地を調製した。

ジフルオロフェノキシウンデカン酸

Na ₂ HPO ₄	2 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Na HCO ₃	1. 5 g

Mg SO ₄ · 7 H ₂ O	0. 2 g
Fe SO ₄ · 7 H ₂ O	0. 02 g

培養終了後、菌体を蒸留水およびメタノールで洗浄し、減圧乾燥して乾燥菌体を得た。このようにして得られた乾燥菌体を3.0°Cで5時間抽出した。菌体除去後、クロロホルム抽出液にメタノールを10倍量加えてポリエステルを沈殿回収した。得られたポリエステルを120°C、90分間メタノリシスを行ない、モノマートをメチルエステルとして光散乱分子量測定装置を備えたキャビラリーガスクロマトグラフにより昇温分析をした。キャビラリーガスクロマトグラフはHewlett Packard社製、光散乱分子量測定装置はmini DAWN（ワイヤットテクノロジー社）を用いて行った。使用したカラムはJ & W社製のヒューズド・シリカ・キャビラリーカラムDB-5（カラム内径0.25 mm、液層膜厚0.25 μm、カラム長30 m）である。初発温度90°C、5分、昇温速度5°C/分、最終温度250°C、2分の条件で行った。図1は得られたポリマーのメチルエステル化処理物のガスクロマトグラフによる分析結果である。図2にはポリエステルの¹³C-NMR (100 MHz) の解析結果であるが、この結果からこのポリエステルが3H5 (DFP) Pユニットの1成分からなるホモポリマーであることが確認された。

【0022】実施例2

実施例1の1段目の培養で炭素源としてクエン酸のかわりにオクタン酸を用いて同様の実験を行った。その結果、3HHx、3HO、3H5 (DFP) Pユニットからなる3成分系の共重合体が得られた。

【0023】実施例3

実施例1の2段目の培養で炭素源としてジフルオロフェノキシウンデカン酸のかわりにモノフルオロフェノキシウンデカン酸を用いて同様の実験を行った。その結果、3H5 (MFP) Pユニットの1成分からなるホモポリマーであることが確認された。

【0024】実施例4

実施例3の1段目の培養で炭素源としてクエン酸のかわりにオクタン酸を用いて同様の実験を行った。その結果、3HHx、3HO、3H5 (MFP) Pユニットからなる3成分系の共重合体が得られた。

【0025】実施例5

実施例1の1段目の培養で炭素源としてクエン酸のかわりにノナン酸を用いて同様の実験を行った。その結果、3HHp、3HN、3H5 (DFP) Pユニットからなる3成分系の共重合体が得られた。

【0026】実施例6

実施例3の1段目の培養で炭素源としてクエン酸のかわりにノナン酸を用いて同様の実験を行った。その結果、3HHp、3HN、3H5 (MFP) Pユニットからなる3成分系の共重合体が得られた。

る3成分系の共重合体が得られた。

【0027】実施例7

フェノキシ基にフッ素基が導入されていないポリマーと2個フッ素基が導入されている同じ構造をもつポリマーの融点を調べたところ約40°Cの差があり、2個のフッ素基をもつポリマーは100°C以上の融点を有していた。

【0028】

【発明の効果】微生物の発酵合成するプラスチックは生分解性プラスチックとして、よく研究されてきた。側鎖中にフッ素基を導入したものは従来より存在したが、ホモポリマーとしてではなく共重合体ユニットとして50%以下しか含有することができなかった。本発明では幅広い資化性をもつショードモナス・ブチダを用いることとフェノキシ基の芳香環上にフッ素基を導入することによりフッ素基をもつユニットを100%含むホモポリマーを合成できた。このポリマーは従来の置換基を含むポリマーが達成できていない融点を100°C以上にすることができ、物性の改良が期待できる。さらに、このポリ*

*マー中に含まれるこれらユニットの量をコントロールすることにより、望ましい物性を得ることができる。また、撥水性、生体内合成に特有の立体規則性に由来する光学分割性も期待することができる。

【要約】

【構成】3-ヒドロキシ、5-(モノフルオロフェノキシ)ベンタノエート(3H5(MFP)P)ユニットあるいは3-ヒドロキシ、5-(ジフルオロフェノキシ)ベンタノエート(3H5(DFP)P)ユニットからなるホモポリマー、少なくとも3H5(MFP)Pユニットあるいは3H5(DFP)Pユニットを含有するコポリマー；これらのポリマーを合成するショードモナス・ブチダ；ショードモナス属を用いた前記のポリマーの製造法に関する。

【効果】置換基をもつ長鎖脂肪酸を資化して、側鎖末端が1から2個のフッ素原子が置換したフェノキシ基をもつポリマーを合成することができ、融点が高く良い加工性を保持しながら、立体規則性、撥水性を与えることができる。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.*

識別記号

F I

(C 12 P 7/62

C 12 R 1:40)

(58)調査した分野(Int.Cl.*、DB名)

C08G 63/00 - 63/91

C12N 1/20 - 1/21

C12P 7/62

CA (STN)

REGISTRY (STN)

THIS PAGE BLANK (USPTO)